

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620130154105

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

**FoxO3 对 Keap1-Nrf2 信号通路的调控及其
在胆管癌肿瘤生长及耐药中的分子机制的
研究**

**FoxO3 Inactivation Promotes Human Cholangiocarcinoma
Tumorigenesis and Chemoresistance through Keap1-Nrf2
Signaling**

管 丽

指导教师姓名: 尤涵 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(尤涵)课题(组)的研究成果,获得(尤涵)课题(组)经费或实验室的资助,在(尤涵)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

目录	1
摘要	7
第一章 前言	9
1.1 胆管癌的研究进展：	9
1.2 FoxO 的研究进展.....	11
1.2.1 概述	11
1.2.2 FoxO3 的蛋白结构.....	11
1.2.3 FoxO3 蛋白表达及翻译后修饰.....	13
1.2.4 FoxO3 的生物学功能	20
1.3 Keap1-Nrf2 信号通路	25
1.3.1 Keap1 的研究进展	26
1.3.2 Nrf2 的研究进展.....	28
1.4 立题背景	35
第二章 材料与方法.....	37
2.1 材料.....	37
2.1.1 质粒载体	37
2.1.2 菌株	40
2.1.3 细胞系.....	41
2.1.4 主要试剂	41
2.1.5 主要仪器	43

2.2 DNA 相关实验方法	45
2.2.1 制备大肠杆菌感受态细胞	45
2.2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳	46
2.2.3 琼脂糖凝胶中回收 DNA	47
2.2.4 DNA 目的片段的连接和转化	47
2.2.5 质粒 DNA 的提取	48
2.2.6 基因组 DNA 的提取	50
2.2.7 PCR 相关实验	51
2.2.8 实时荧光定量 PCR	52
2.2.9 RNA 干扰载体的构建	54
2.3 蛋白相关实验	56
2.3.1 全细胞裂解液的制备	56
2.3.2 蛋白浓度测定 (BCA 法)	57
2.3.3 蛋白质免疫印迹	57
2.3.4 荧光素酶活性检测	60
2.3.5 染色质免疫共沉淀	62
2.4 细胞培养及相关实验	64
2.4.1 细胞培养	64
2.4.2 细胞传代	65
2.4.3 细胞转染	66
2.4.4 慢病毒介导的 RNA 干扰	67
2.4.5 流式细胞仪检测 ROS 水平	68

2.4.6 MTT 法	69
2.4.7 软琼脂克隆形成实验	70
2.4.8 裸鼠皮下异位种植瘤模型	71
2.4.9 数据统计分析	71
第三章 结果与讨论.....	73
3.1 结果	73
3.1.1 FoxO3 失活能够下调 Keap1 的表达并激活 Nrf2 信号通路	73
3.1.2 FoxO3 失活通过激活 Nrf2 信号通路进而调节胆管癌细胞内 ROS 的水平.....	79
3.1.3 FoxO3 对 Nrf2 的调控是 Keap1 依赖性的	86
3.1.4 FoxO3 转录调控 Keap1	90
3.1.5 激活的 AKT 通过调控 FoxO3-Keap1 主轴激活 Nrf2 信号通路..	93
3.1.6 TNF α 通过调控 FoxO3-Keap1 主轴激活 Nrf2 信号通路	101
3.1.7 FoxO3 通过 Nrf2 信号通路调控胆管癌肿瘤生长及耐药性	110
3.2 讨论.....	118
参考文献	123
图表索引	139
在学期间发表论文	143
致谢	144

TABLE OF CONTENT

TABLE OF CONTENT	4
ABSTRACT	8
CHAPTER ONE BACKGROUND	9
1.1 The research progress of cholangiocarcinoma	9
1.2 The research progress of FoxO.....	11
1.2.1 Introduction.....	11
1.2.2 The structure of FoxO3 protein.....	11
1.2.3 The transcriptional regulation and posttranslational modification of FoxO3.....	13
1.2.4 Biological functions of FoxO3.....	20
1.3 The Keap1-Nrf2 signaling pathway	25
1.3.1 The research progression of Keap1	26
1.3.2 Nrf2 research progression	29
1.4 Purpose and Significance of this thesis	35
CHAPTER TWO MATERIALS AND METHODS	37
2.1 Materials	37
2.1.1 Plasmid vectors	37
2.1.2 Bacterial strains	40
2.1.3 Cell lines	41
2.1.4 Chemicals and reagents.....	41
2.1.5 Equipments	43
2.2 DNA work.....	45
2.2.1 Preparation of <i>E.coli</i> competent cells	45
2.2.2 Agarose gel electrophoresis	46
2.2.3 Purification of DNA fragments from agarose gel.....	47
2.2.4 DNA Ligation and transformation.....	47

2.2.5 Plasmid DNA preparation	48
2.2.6 Genomic DNA extraction	50
2.2.7 PCR reactions	51
2.2.8 Real Time Quantitative PCR.....	52
2.2.9 Consturction of RNA interference vectors.....	54
2.3 Experiments and methods for protein work.....	56
2.3.1 Preparation of total cell lysates.....	56
2.3.2 Measurement of protein concentration by BCA method	57
2.3.3 Western blotting analysis.....	57
2.3.4 Luciferase activity analysis	60
2.3.5 Chromatin immunoprecipitation	62
2.4 Cell culture and related experiment	64
2.4.1 Cell culture	64
2.4.2 Cell passage.....	65
2.4.3 Cell transfection.....	66
2.4.4 Lentivirus mediated RNA interference	67
2.4.5 FACS analysis of ROS level	68
2.4.6 MTT assay.....	70
2.4.7 Soft agar assay.....	70
2.4.8 Nude mice xenograft tumor model.....	71
2.4.9 Statistics analysis	71
CHAPTER THREE RESULT AND DISCUSSION	73
3.1 Result.....	73
3.1.1 FoxO3 inhibition leads to down-regulation of Keap1 and activation of Nrf2 signaling	73
3.1.2 FoxO3 depletion confers resistance to redox stress through Nrf2 signaling	80
3.1.3 FoxO3 regulates Nrf2 in a Keap1-dependent manner	86
3.1.4 FoxO3 directs Keap1 Transcription	90

3.1.5 Dysregulated AKT signaling activates Nrf2 through Foxo3-Keap1	932
3.1.6 Down-regulation of FoxO3-Keap1 axis contributes to tumor necrosis factor α -mediated Nrf2 activation	1010
3.1.7 FoxO3 regulates oncogenesis and drug resistance through the Nrf2 pathway	110
3.2 Discussion	118
REFERENCE	123
INDEX OF FIGURES AND TABLES.....	139
PUBLICATIONS.....	143
ACKNOWLEDGMENT.....	144

摘要

许多人类肿瘤中存在 PI3K/AKT 过度激活,然而该通路的异常导致肿瘤形成的分子机理仍未充分阐明。FoxOs 是受 PI3K/AKT 负向调控的转录因子,与肿瘤形成密切相关,但对于 FoxOs 调控肿瘤生长的机制尚不十分清楚。胆管癌是一类起源于胆道上皮细胞的恶性肿瘤,胆管癌患者对化疗敏感性差,但耐药机理尚未充分阐明。Nrf2 的激活与胆管癌耐药性及病人不良预后密切相关。高度激活的 PI3K/AKT 能够激活 Nrf2 信号通路,但其中具体的分子机制尚不清楚。Keap1 是连接 Nrf2 与 Cul3 的衔接蛋白,介导 Nrf2 通过蛋白酶体途径进行降解,目前关于 Keap1 的转录调控几乎未知。我们研究证实,Keap1 是 FoxO3 的下游靶基因,敲低 FoxO3 导致 Keap1 的转录下调,从而激活 Nrf2 信号通路。我们进一步研究发现,在胆管癌细胞中持续激活 AKT 信号或者 TNF α 处理胆管癌细胞,均能明显抑制 FoxO3 的表达水平和转录活性,进而抑制 Keap1 的表达,最终导致 Nrf2 信号通路的激活。前期报道认为 FoxO3 通过转录下调 MnSOD 及 catalase 可以增强细胞内活性氧水平,但是我们研究发现:缺失 FoxO3 的细胞通过激活 Nrf2 可以降低胞内活性氧的水平,从而保护细胞免受氧化压力的伤害。最重要的是,利用裸鼠皮下移植瘤模型,我们发现 FoxO3 缺失通过激活 Nrf2 信号通路能够促进胆管癌细胞的体内成瘤能力,同时增强肿瘤细胞对 cisplatin 的耐药性。在临床胆管癌样本中,我们检测到磷酸化的 AKT 与 Keap1 的 mRNA 水平呈负相关,磷酸化的 AKT 与 Nrf2 蛋白水平呈正相关,FoxO3 mRNA 与 Keap1 mRNA 的表达水平呈正相关性,FoxO3 mRNA 与 Nrf2 蛋白的表达水平呈负相关性,这些蛋白的相关性进一步阐明了 FoxO3 对 Keap1-Nrf2 信号通路的调控及其在胆管癌肿瘤生长及耐药中的分子机制。

关键词: FoxO3; 耐药性; 肿瘤形成;

Abstract

The PI3K/AKT pathway is one of the most dysregulated signaling cascades in human cancers. However, the mechanism underlying PI3K/AKT signaling in tumorigenesis is unclear. FoxO transcription factors which are negatively regulated by PI3K/AKT pathway have been reported to play pivotal roles in tumorigenesis and drug resistance. The mechanisms underlying the tumor suppression function of FoxOs in human cancers remain largely unknown. Aberrant expression and activation of Nrf2 often correlate with chemoresistance and poor prognosis. Here, we report that FoxO3 directs the basal transcription of Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), an adaptor protein that bridges Nrf2 to Cul3 for degradation. FoxO3 depletion resulted in Keap1 down-regulation, thereby activating Nrf2 signaling. We further demonstrated that inhibition of the FoxO3-Keap1 axis accounts for Nrf2 induction and activation induced by constitutively active AKT signaling or tumor necrosis factor α treatment. Unlike previous findings, FoxO3 silencing led to decreased reactive oxygen species production, therefore protecting cells from oxidative stress-induced killing in an Nrf2-dependent manner. Importantly, FoxO3 deficiency strongly potentiated tumor formation in nude mice and rendered cholangiocarcinoma xenografts resistant to cisplatin-induced cell death by activating Nrf2. Additionally, we found that clinical cholangiocarcinoma samples displayed FoxO3-Keap1 down-regulation and Nrf2 hyperactivation, underscoring the essential roles of these proteins in cholangiocarcinoma development. Conclusion: Our results unravel a unique mechanism underlying the tumor suppressor function of FoxO3 through constraining Nrf2 signaling.

Key words: FoxO3; chemoresistance; tumorigenesis;

第一章 前言

Chapter One Background

1.1 胆管癌的研究进展：

1.1 The research progress of cholangiocarcinoma

胆管癌（cholangiocarcinoma, CCA）是从左右肝管汇合部起始，延伸至胆总管下端的一种严重危害患者生命安全的恶性肿瘤。CCA的恶性程度仅次于肝癌，约占胃肠道肿瘤的3%，近年来在全球的发病率有逐渐上升的趋势。根据肿瘤所在部位可将胆管癌分为肝外胆管癌、肝门部胆管癌和肝内胆管癌（图1.1），其中肝内胆管癌起源于肝内胆管上皮细胞，约占10%；肝外胆管癌起源于肝外胆道系统，占90%左右，经常位于胆总管分叉处。根据胆管癌肿瘤距离肝门的位置，又将肝外胆管癌分为肝门胆管癌和远端胆管癌^[1]。

导致胆管癌发病的因素有很多，主要包括：年龄、慢性炎症、化学致癌物、感染、肝硬化、慢性肝胆结石、胆管多发性乳头瘤病、胆管囊肿、胆管寄生虫病和伤寒沙门菌慢性携带者、部分先天性疾病和一些不良的生活习惯。最新研究发现，肝内胆管癌与糖尿病有关；此外，原发性硬化性胆管炎是目前比较明确的胆管癌诱发因素，而在亚洲地区，肝胆管结石是胆管癌发生相对常见的高危因素^[2-4]。

目前关于胆管癌的分子生物学研究已经取得了重大的进展，而胆管癌的研究热点也主要集中在胆管癌的基因损伤与修复、表观遗传学以及信号转导调控等方面。在基因水平上，例如，CCA相关的癌基因与抑癌基因的发现、细胞信号传导通路的调控、基因融合及突变、基因型的分类、生长因子等的调控、微卫星杂合性缺失、DNA非整倍体性、细胞核形态学等的研究成果也为探索胆管癌发病及耐药性产生的分子机制提供了新的方法和理论依据^[5-7]。

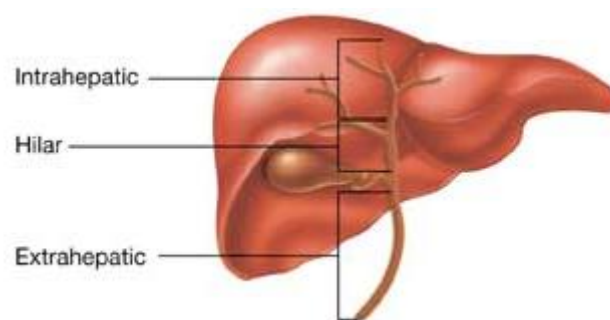


图1.1 胆管癌的发生部位，引自文献^[8]

Figure 1.1 The anatomic location of cholangiocarcinoma

近年来,随着胆管癌发病率提高,并且胆管癌耐药性的存在导致化疗失败,所以研究胆管癌耐药性的机制成为目前胆管癌研究热点。目前,关于胆管癌耐药的研究主要包括以下几种机制:Chen Q等研究发现,AIB1部分通过上调Bcl-2的表达,从而促进胆管癌细胞的耐药性增强^[9];此外,Herraez E等研究发现,SLC22A1通过调控OCT1的表达调控胆管癌细胞对药物sorafenib的摄取,进而影响胆管癌细胞的耐药性^[10];最近,Marti P等报道称,YAP通过调控转录因子TEAD的表达进而调控胆管癌细胞的增殖、耐药及血管生成^[11];另外,Leelawat K等报道称,胆管癌细胞中CD133的高表达在促进胆管癌的转移与耐药性方面也发挥着重要的作用^[12]。由于胆管癌患者早期没有表现出明显的临床症状,并且其恶性程度很高并且发展迅速,所以大多数胆管癌患者在确诊时已属于晚期,预后极差。目前,手术切除是治疗胆管癌最主要的方法,但术后5年生存率不高。由于胆管癌所处的解剖位置特殊,以浸润性生长为特征,病变区域与周围组织分界不清,造成手术切除困难,术后易复发,同时胆管癌容易通过局部浸润及淋巴转移、腹腔种植等方式发生转移,这进一步造成手术根治率低并且预后差。化疗是治疗胆管癌的重要医学手段,临床治疗胆管癌常用的化疗药物有顺铂^[13],5-氟尿嘧啶^[14],丝裂霉素C^[15]等。然而在胆管癌的临床治疗中,细胞常对化疗药物(顺铂等)产生耐药性,结果往往导致化疗失败。并且进一步发现及研究胆管癌的分子标志物及其作用机制,有利于胆管癌的早期诊断,对提高胆管癌病人的预后具有重要临床指导意义。因此研究胆管癌产生耐药的分子机制成为治疗胆管癌的迫切需求。

1.2 FoxO 的研究进展

1.2 The research progress of FoxO

1.2.1 概述

1.2.1 Introduction

FoxO家族是一大类含有Forkhead box结构域并且进化保守的转录因子的统称。在哺乳动物细胞中，FoxO转录因子包括FoxO1(FKHR)、FoxO3(FKHRL1)、FoxO4(AFX)以及FoxO6，它们有一个共同的 Forkhead DNA结合结构域，在细胞中的表达具有时空特异性；其中FoxO1在脂肪组织中高表达，FoxO3在脑、心脏、脾、肾等器官中高表达，FoxO4在骨骼肌中有较高表达，而FoxO6主要在发育的脑组织中特异表达^[16, 17]。在人体的许多细胞中都可以检测到FoxO3，但是在许多肿瘤细胞中，FoxO3的表达和活性都降低^[18]。

FoxO是胰岛素信号通路中的重要调控分子，其转录活性主要受PI3K/AKT信号通路调控。FoxO被活化的PI3K/AKT磷酸化，进而被泛素-蛋白酶体所降解。许多人类肿瘤中存在PI3K/AKT过度激活或者PTEN失活，但该通路的异常导致细胞恶变的分子机理仍未充分阐明。PTEN通过抑制AKT的活性从而正向调控FoxO的核转录因子功能。FoxO转录因子作为体内最重要的应激反应应答分子之一，其生物学功能涵盖范围甚广，在细胞周期调控、细胞分化、细胞凋亡、抗氧化应激反应、细胞代谢、DNA损伤修复、干细胞稳态平衡及细胞自噬等方面都发挥重要作用（图1.8）。FoxO转录活性亦受到磷酸化、乙酰化、赖氨酸甲基化等在内的多种蛋白翻译后修饰的调控^[19]。

1.2.2 FoxO3 的蛋白结构

1.2.2 The structure of FoxO3 protein

FoxO3包括4个结构域：高度保守的DNA结合区域（Forkhead DBD）、核

定位信号区域（NLS）、核输出信号序列（NES）和羧基端的转录激活区域（TA domain）（图1.2）^[20]。FoxO3 DNA结合区域位于多肽链的N端，覆盖15~17bp，呈非对称结构，称为Fox（Forkhead box）结构域，它由约110个氨基酸构成，由三个 β 折叠和 α 螺旋组成，其中两个Helix three（H3）是DNA识别和结合区域，两侧各有一个“翼”状环，即“winged loop”区，因此这类转录因子又被称为Forkhead /winged helix转录因子（图1.3）^[21]；FoxO通过DNA结合区域与一段保守DNA序列（G/C）（T/A）AA（C/T）AA相结合，该结合位点又被称为FBE（Forkhead binding element）。在DBD后紧接着的是核定位信号NLS，它对FoxO3的细胞内定位及转录后的修饰起重要作用。转录激活结构域位于蛋白的C端，它们都含有一个核定位或出核相关序列来调控它们在细胞内的定位，以发挥不同的功能。根据结合的启动子及转录辅助因子不同，它们可以发挥促进或抑制下游靶基因的转录。此外，在FoxO3的H2-H3中包含五个额外的氨基酸组成的环，此环的功能还未知。FoxO3共含有673个氨基酸，其蛋白理论分子质量是大约72 kDa，但在蛋白质免疫印迹中它一般在90 kDa的位置。

FoxO3的氨基酸序列中包含3个高度保守的AKT磷酸化位点：第一个磷酸化位点位于起始密码子之后（Thr32），第二个磷酸化位点位于Forkhead区（Ser253），第三个紧随Forkhead区（Ser315）；AKT磷酸化FoxO3后能促进其通过蛋白酶体途径降解。AKT识别的氨基酸序列（RXRXXS/T）在果蝇和人类FoxO中高度保守。

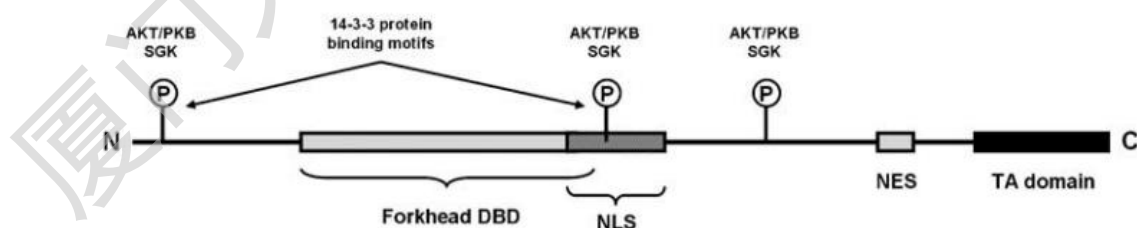


图 1.2 FoxO3 的结构域，引自文献^[20]

Figure1.2 Schematic representation of primary structure of FoxO proteins.

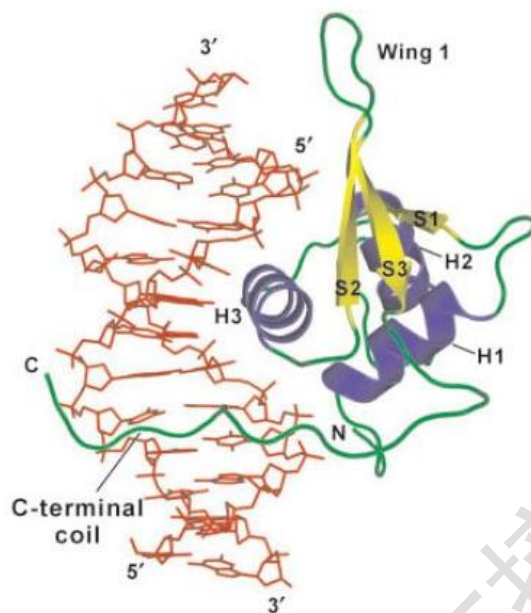


图 1. 3 FoxO3 的蛋白结构，引自文献^[21]

Figure1.3 The complete structure of FoxO3a-DBD/DNA complex. The secondary structure elements and the N and C termini of FoxO3a-DBD are labeled. The 14 bp DNA is colored red. H and S are abbreviations for helix and strands, respectively.

1.2.3 FoxO3 蛋白表达及翻译后修饰

1.2.3 The transcriptional regulation and posttranslational modification of FoxO3

细胞内FoxO3蛋白的表达及活性受多种方式调控，包括FoxO3的转录合成、FoxO3的翻译后修饰及FoxO3的降解等。蛋白的翻译后修饰对于 FoxO3蛋白稳定性及转录活性的调控起重要作用，主要的蛋白修饰形式包括磷酸化（phosphorylation）、乙酰化（acetylation）、泛素化（ubiquitination）和去泛素化（deubiquitination）、赖氨酸甲基化（lysine methylation）等^[22, 23]。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.